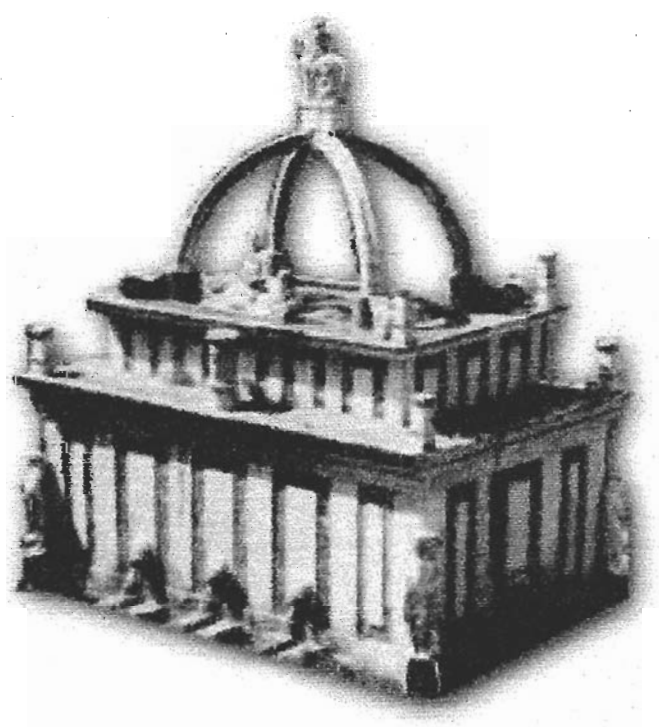


APIV
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI
ORDINE DEI MEDICI VETERINARI DELLA PROVINCIA DI SASSARI
I.Z.S. DELLA SARDEGNA "G.PEGREFFI"
ASVAC

ATTI DEL XVII CONVEGNO DELL'ASSOCIAZIONE ITALIANA DEI PATOLOGI VETERINARI



Sassari, 26-27 marzo 1999

OSSERVAZIONI SU DUE CASI DI SCRAPIE IN CAPRE DELLA PROVINCIA DI REGGIO-EMILIA.

D. Gelmetti, L. Gibelli, L. Capucci, I. Barbieri, M. Tamba, M. Dottori, G. Cammarata*

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia- Brescia.

* Ist. di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia. Aviare-Università di Milano.

RIASSUNTO

Viene segnalato un caso di Scrapie diagnosticato in due capre appartenenti ad un allevamento ovi-caprino della provincia di Reggio Emilia. La diagnosi è stata perfezionata attraverso l'esame istologico dell'encefalo ed integrata dalla dimostrazione immunoistochimica e in western-blot della PrP^{sc}. Poichè nelle pecore conviventi non erano stati osservati sintomi neurologici sospetti, e poichè le capre erano vaccinate contro la agalassia contagiosa la diffusione jatrogena della malattia sembra molto probabile, analogamente a quanto potrebbe essere avvenuto in altri focolai verificatisi nel centro e nel sud Italia.

INTRODUZIONE

Il primo segnalamento di Scrapie naturale nelle capre è del francese Chelle nel 1942, mentre le prime descrizioni dettagliate della malattia, riprodotta sperimentalmente, sono riferite da Hadlow (1961) e da Zlotnik (1961). Successivamente ricercatori scozzesi (Brotherstone et al, 1968) hanno potuto dimostrare che giovani capre conviventi per lunghi periodi con pecore naturalmente malate di Scrapie potevano contrarre la malattia. Pur rimanendo la malattia più rara nelle capre che nelle pecore, ulteriori focolai di Scrapie in capre sono stati segnalati negli Stati Uniti (Hourrogan et al, 1969; Hadlow et al. 1980), nel Regno Unito (Harcourt and Anderson, 1974; Wood and Done, 1992; Wood et al, 1992; Andrews, 1992; Hadlow et al. 1980) ed in Francia (Perrin et al. 1991). In Italia la Scrapie naturale nelle capre è stata segnalata per la prima volta in 4 allevamenti siciliani ovi-caprini e in 4 greggi caprini pulgiesi dove è comparsa in modo improvviso e simultaneamente (Capucchio et al, 1998, CEA, 1997 comunicazione personale). Tuttavia, Andrews (1998) ed Agrimi et al (1999) sono dell'opinione che, data l'elevata incidenza riscontrata in breve periodo di tempo, sia più probabile trattarsi di infezione jatrogena. Data l'attenta sorveglianza dedicata a questa malattia in Europa si ritiene interessante segnalare la recente comparsa in un allevamento della provincia di Reggio Emilia ove la malattia era stata osservata sporadicamente nelle pecore ma mai nelle capre (Guarda et al., 1991; Perini, 1989 comunicazione personale).

MATERIALI E METODI

Sono state conferite alla sezione diagnostica di Reggio Emilia, in tempi successivi, due capre: un becco di circa 5 anni ed una capra di 3 anni. Il becco è stato trovato morto, in scadente stato di nutrizione, lungo l'argine di un fiume. La capra è stata soppressa in fase di avanzato decadimento

organico. L'allevamento di origine dei due animali è di tipo misto ovi-caprino costituito da circa 150 capre ibride e 500 pecore di razza sarda. Negli ultimi anni il pastore riferiva un aumento della mortalità (circa 30 capi nel biennio 1996-97) nelle capre adulte. La sintomatologia: dimagrimento, emaciazione e morte, non ha mai interessato gli ovini. Sintomi neurologici e turbe comportamentali erano assenti in entrambe le specie. L'indagine epidemiologica rilevava che nel 1990 erano state acquistate 150 pecore marchigiane rivelatesi affette da mastite da micoplasmi. In seguito a ciò, nel biennio 1991-92, è stata introdotta, oltre alla regolare vaccinazione contro le clostridiosi ed i periodici trattamenti antiparassitari, una vaccinazione contro l'agalassia contagiosa.

Esami di laboratorio

Gli organi (encefalo, polmone, fegato, milza e rene) sono stati sottoposti esame batteriologico secondo le metodiche di Carter (1994). Entrambi gli encefali e la tonsilla della capra sono stati avviati ad indagine istologiche-immunoistochimiche e di immunoblotting. Seguendo un protocollo interno d'intervento il materiale prelevato era suddiviso in due parti rispettivamente fissato in formalina tamponata al 10%, e conservato a -20°C.

Esami neuropatologici

Da sezioni coronali dello spessore di circa 1 cm sono stati ricavati campioni inclusi in paraffina delle aree dei nuclei della base, talamo, mesencefalo, ponte, cervelletto e midollo allungato. Da detti campioni sono state allestite sezioni di circa 5µm colorate con Ematossilina-Eosina (EE). Alle stesse colorazioni sono state sottoposte anche sezioni microtomiche di tonsilla palatina.

Colorazione immunoistochimica della PrP^{sc}

Sezioni seriate di 5µm dei campioni inclusi sono state sparaffinate, reidratate e sottoposte alla colorazione immunoistochimica con: 1) un MAb FH11 verso la PrP di pecora diluizione d'uso 1:500 (fornitoci dal dr. C.R.Birkett- Institute for Animal Health, Compton Laboratory), 2) un anticorpo policlonale prodotto a partire da un peptide sintetico costituito da 15 aminoacidi corrispondenti alla sequenza 97-111 della PrP di pecora diluizione d'uso 1:500 (Gelmetti et al., 1998).

La colorazione immunoistochimica è stata preceduta da un trattamento di unmasking mediante passaggio in fenolo 85% per 30 minuti, autoclave (pentola a pressione) in acqua distillata per 10 min., soluzione di guanidina tiocianato 2M per 2 ore. Successivamente le sezioni sono state 1) incubate a +4°C per una notte con i 2 anticorpi primari; 2) incubate con un sistema rivelatore streptoavidina-biotina utilizzando come cromogeno la 3-3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma); 3) controcolorate con E-E per 5 min. I controlli erano rappresentati da: 1) siero di capra normale diluito 1:20 incubato sul campione in esame; 2) una sezione coronale di ponte encefalico negativo

per Scrapie, incubata con i sieri in esame opportunamente diluiti; 3) una sezione coronale di ponte encefalico positiva per Scrapie, incubata con i sieri in esame opportunamente diluiti.

Western Blotting

0,5 g di tessuto cerebrale e di tonsilla palatina sono stati omogeneizzati al 10% w/v in tampone di estrazione (100mM NaCl, 0,5% Nonidet P40, 0,5% Na-deossicolato, 10mM EDTA, 10mM Tris HCl, pH 7,4), sonicati e centrifugati a 2000 rpm per 5 min.. Aliquote degli omogenati sono stati bolliti per 5 min. in presenza di sample buffer (2% b-mercaptoetanolo, 1,5% SDS, 60mM Tris-HCl, pH 6,8, glicerolo 10%), separati mediante gel di poliacrilamide al 12% ed elettro-trasferiti su Immobilon P (Millipore). Dopo saturazione (1.5 h in 5% latte in polvere in phosphate buffered-saline) le membrane sono state incubate overnight a 4°C con un siero di coniglio anti PrP di pecora (sequenza aa 97-11). Dopo incubazione con l'anti-igG di coniglio coniugata con HRP, la reazione è stata rivelata tramite chemiluminescenza (ECL, Amersham). Per il rilevamento della PrP^{Sc} gli omogenati sono stati digeriti con proteinasi K (20µg/ml) per 1 h a 37°C e poi trattati con il sample buffer sopra descritto. I materiali biologici e gli strumenti venivano decontaminati secondo le procedure in uso per gli agenti patogeni non convenzionali (Taylor, 1996).

RISULTATI

La necropsia non evidenziava alterazioni di rilievo a parte le scadenti condizioni di nutrizione di entrambi gli animali e, limitatamente al becco, edema polmonare ed aree marginali di broncopolmonite. Gli esami batteriologici hanno dato esito negativo per batteri patogeni e per micoplasmi. All'esame istologico dell'encefalo, in entrambe le capre, si osservava, sebbene con diverso grado di estensione e gravità, microvacuolizzazione del neuropilo particolarmente evidente in corrispondenza della commessura anteriore, dei nuclei caudato, pallido e putamen. Nel talamo, mesencefalo, ponte e midollo allungato la spongiosità del neuropilo era ancora più accentuata. I nuclei talamici, sub talamici, pontini e del midollo allungato apparivano spopolati ed i neuroni residui erano in parte vacuolizzati. Nel mesencefalo l'entità delle vacuolizzazioni neuronali, con neuroni aumentati di volume per la presenza di ampi vacuoli multipli che conferivano al loro citoplasma un aspetto schiumoso a grosse bolle, era particolarmente evidente. All'esame immunostochimico i due sieri utilizzati, anche se con diverso grado d'intensità, riconoscevano la PrP^{Sc} che appariva, in parte sparsa nelle aree spongiotiche, in parte concentrata nel citoplasma degli astrociti compresi i loro prolungamenti e si presentava sotto forma di placchette a contorni sfumati, isolate o confluenti. Non si notavano addensamenti di PrP^{Sc} attorno ai vasi e parimenti negativi erano i neuroni sia vacuolizzati che di aspetto normale. Nel cervelletto i depositi di PrP^{Sc} erano nello strato molecolare, più addensati in prossimità dello strato dei granuli e, localmente anche all'interno

di quest'ultimo. L'esame istologico della tonsilla palatina rivelava una lieve tonsillite catarrale. La colorazione immunoistochimica marcava positivamente il citoplasma di elementi linfo-istiocitari nei centri germinativi di numerosi follicoli linfatici. L'Western blotting, eseguito in parallelo con un campione di pecora positivo per Scrapie e con i relativi controlli negativi, risultava positivo come indicato da : 1) il permanere di una reattività del campione anche dopo trattamento con proteinasi K; 2) la diminuzione del peso molecolare della parte principale della PrP da 33-30 Kd a 27-30 Kd; 3) la presenza del classico pattern di distribuzione della PrP^{sc} con tre bande ben distinte corrispondenti alle forme diglicosilata, monoglicosilata e non glicosilata.

La diagnosi di Scrapie formulata sulla base dei risultati illustrati è stata ulteriormente confermata dal Centro di referenza per lo studio delle encefalopatie animali e neuropatologie comparate.

DISCUSSIONE

Le capre sono sensibili alla Scrapie e quando conviventi con pecore malate possono contrarre la malattia (Harcourt et al, 1974; Hourrigan et al. 1969; Andrews et al 1992). Tuttavia, nel nostro caso, l'indagine epidemiologica sia attuale che retrospettiva, non ha evidenziato la presenza di sintomi neurologici nelle pecore conviventi. Inoltre, benchè tutti gli animali fossero stati vaccinati circa 4 anni prima, con un vaccino inattivato contro l'agalassia contagiosa contenente mammelle ed encefali di pecore affette da *Mycoplasma agalactiae*, solo le capre adulte avevano manifestato grave deperimento organico ed aumento della mortalità (30 animali erano deceduti nel biennio 1996-97). Una mortalità così elevata, concentrata in un periodo così breve, in una sola delle specie allevate difficilmente sembra imputabile ad un'infezione naturale di Scrapie che, come è ben noto, è caratterizzata da bassa incidenza (Liberski, 1993). Pertanto l'ipotesi di una trasmissione jatrogena della Scrapie sembra più probabile rispetto ad un'infezione orrizontale da pecora a capra. L'assenza di sintomi clinici nelle pecore potrebbe infatti essere giustificata dalla naturale resistenza che alcuni ovini dimostrano verso alcuni ceppi di Scrapie (Prusiner, 1988; Liberski, 1993). Attualmente tutti gli animali presenti in allevamento appaiono asintomatici e, considerata l'anamnesi del gruppo ed in particolare, il picco di mortalità registrato nel biennio 1996-97, è presumibile che i casi di Scrapie qui segnalati siano relativi ad un focolaio ormai in fase di spontanea regressione. Se non fosse stato per il becco rinvenuto morto fuori dall'allevamento e per le indagini inerenti il focolaio sarebbe potuto restare inosservato. I risultati ottenuti concorrono alla raccolta dei dati epidemiologici sulla diffusione della Scrapie nel patrimonio ovi-caprino nazionale e rafforzano l'ipotesi jatrogena dei recenti episodi di Scrapie segnalati nelle capre. Infatti, sia nei focolai segnalati negli ultimi anni nel centro sud dell'Italia, sia nel focolaio da noi descritto, gli animali erano stati inoculati con vaccini contro l'agalassia contagiosa prodotti dallo stesso laboratorio (Capucchio et al, 1998; Agrimi et al,

1999). La sicura differenziazione tra Scrapie naturale e jatrogena permetterebbe di ridimensionare l'allarme connesso all'elevata morbilità della Scrapie negli allevamenti italiani.

BIBLIOGRAFIA

1. Agrimi U, Ru G, Cardone F, Pocchiari M, Caramelli M: Epidemic of trasmissible spongiform encephalopathy in sheep and goats in Italy. *Lancet* **353**: 560-561, 1999
2. Andrews AH; Laven R; Matthews JG: Clinical observation on four cases of scrapie in goats. *Vet Rec* **130**:101, 1992.
3. Andrews AH: Natural occurrence of scrapie in goats in Italy. *Vet Rec* **31**:512,1998.
4. Brotherstone JG; Renwick CC; Stamp JJ; Zlotnik I; Pattison IH: Spread of scrapie by contact to goats and sheep. *J comp Pathol* **78**:9-17, 1968.
5. Chelle PL: Un cas de tremblante chez la chèvre. *Bull Acad Vet Fr* **15**:294-295, 1942.
6. Capucchio MT; Guarda F; Isaia MC; Caracappa S; Di Marco V: Natural occurrence of scrapie in goats in Italy. *Vet Rec* **143**: 452-453, 1998.
7. Carter GR: Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycolgy edited by Charles C Thomas Publisher, Springfield Illinois-USA, 1994
8. Gelmetti D; Gibelli L; De Simone F; Barbieri I; Vecchi G; Cammarata G; Tagliavini F: Monitoraggio di encefalopatie da virus lenti e Scrapie negli ovini- Ricerche finalizzate del Ministero della Sanità N° 26-1995, 1998.
9. Guarda F, Valenza F, Cantini Cortellezzi G: Epidemiologia e diffusione della Scrapie in Italia. *Nuovo Prog Vet XLVI (2)*: 56-58, 1991
10. Hadlow WJ: The pathology of experimental scrapie in the dairy goat. *res Vet Sci* **2**: 289-314, 1961.
11. Hadlow WJ; Kennedy RC; Race RE, Eklund CM: Virologic and neurohistologic findings in dairy goats affected with natural Scrapie. *Vet. Pathol* : **17** 187-199, 1980.
12. Harcourt RA, Anderson MA: Naturally-occurring scrapie in goats *Vet Rec* **1**:504, 1974.
13. Hourrigan JL; Klingsporn AL, McDaniel HA; Riemenschneider MN: Natural scrapie in goat. *J Am Vet Med Assoc* **154**:538-539, 1969.
14. Liberski PP: The enigma of slow viruses fact and artefact. *Archiv Virology* **6**: 50-61, 1993.
15. Perrin GG; Perrin GJ; Benoit C: Detection of scrapie-associated fibrils in scrapie in goats. *vet Rec* **129**:432, 1991.
16. Prusiner SB: Molecular structure, biology and genetics of prions. *Adv Virus Res* **35**: 83-136, 1988.
17. Taylor DM: The resistance of the bovine spongiform encephalopathy agent to inactivation. *B.C.V.A. Edimburgh* 443-446, 1996
18. Zlotnik I: The histopathology of the brain of goats affected with scrapie. *J Comp Pathol* **71**: 440-448, 1961.
19. Wood JLN, Done SH: Natural scrapie in goats: neuropathology. *Vet Rec* **131**:93-96, 1992.
- Wood, JLN; Done SH; Pritchard GC; Wooldridge MJA: Natural scrapie in goats: case history and clinical signs. *Vet Rec* **131**:66-68, 1992.